

Metformin

Citation for published version (APA):

Out, M. (2018). *Metformin: Pharmacogenetics and Metabolic Effects*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Gildeprint Drukkerijen. <https://doi.org/10.26481/dis.20180709mo>

Document status and date:

Published: 01/01/2018

DOI:

[10.26481/dis.20180709mo](https://doi.org/10.26481/dis.20180709mo)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

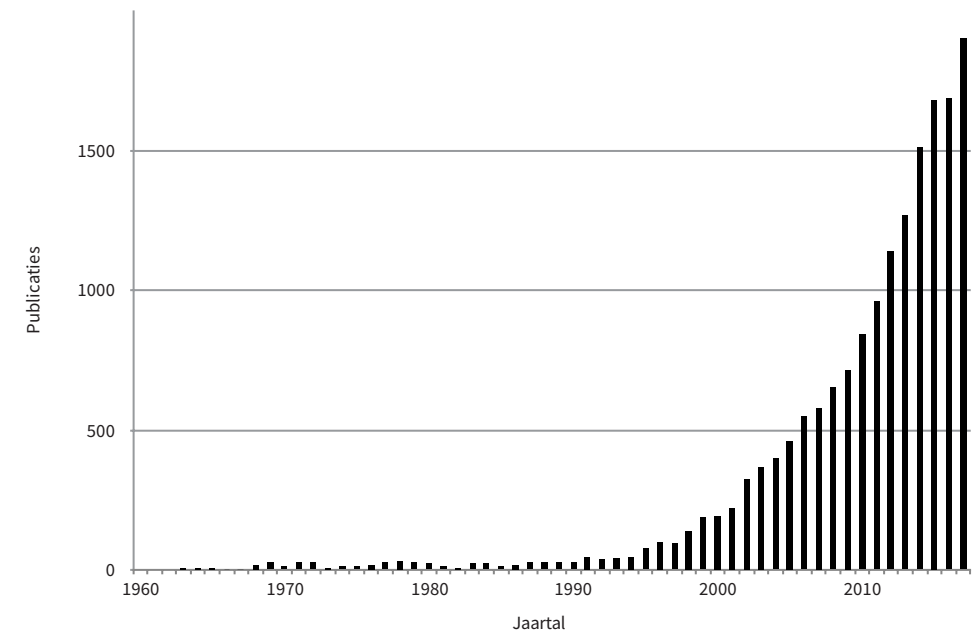
Samenvatting

ACHTERGROND EN HISTORISCH PERSPECTIEF

Zestig jaar nadat metformine voor het eerst werd voorgeschreven voor diabetes¹ en twintig jaar na de publicatie van de resultaten van de United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)² is metformine de eerste keus voor medicamenteuze behandeling voor patiënten met diabetes mellitus type 2.³ Metformine wordt jaarlijks meer dan honderd miljoen keer voorgeschreven. Zelfs na zestig jaar is er nog veel te ontdekken aan de effecten van metformine en de manier waarop metformine werkt. Het aantal jaarlijkse wetenschappelijke publicaties over metformine neemt nog altijd toe, tot bijna tweeduizend in 2017 (figuur 1).

De HOME studie

Het studieprotocol voor de Hyperinsulinemia: the Outcome of its Metabolic Effects (HOME) studie werd eind jaren negentig geschreven. Destijds golden sulfonyleureumderivaten nog als de eerste keus bij behandeling van diabetes mellitus type 2. In Nederland werd metformine in 1999 voor het eerst opgenomen als voorkeursbehandeling in de richtlijnen, maar alleen voor patiënten met een body mass index boven de 27 kg/m².⁴ Pas in 2006 werd metformine in een herziening van de Nederlandse richtlijnen genoemd als eerste keuze voor medicamenteuze behandeling bij alle patiënten met diabetes mellitus type 2.⁵ Het primaire doel van de HOME studie was om te onderzoeken of metformine beschermt tegen microvasculaire of macrovasculaire schade bij diabetes mellitus type 2. Dit is het derde proefschrift dat gebaseerd is op de resultaten van de HOME studie, met een vierde op komst. In 2004 publiceerde Michiel Wulffelé de kortetermijnresultaten van metformine op glucoseregulatie, insulinebehoefte en vitamine B12.⁶ In 2010 publiceerde Jolien de Jager haar proefschrift, waarin ze de langetermijneffecten van metformine beschreef op glucoseregulatie, microvasculaire en macrovasculaire eindpunten en vitamine B12-gehalte.⁷ De HOME studie is wereldwijd nog altijd de grootste lange termijn placebogecontroleerde studie met metformine bij diabetes mellitus type 2. Een recente meta-analyse noemde de studie als het onderzoek met het laagste risico op bias van de geïncludeerde metformine onderzoeken.⁸ Bovendien was de HOME studie het eerste gerandomiseerde langetermijnonderzoek naar de effecten van metformine op vitamine B12.⁹



Figuur 1. Aantal jaarlijkse publicaties over metformine (bron: PubMed).

Het Metformin Genetics Consortium (MetGen)

Gedurende het laatste decennium is de aandacht van het onderzoek met metformine verschoven van glucoseregulatie naar andere onderwerpen zoals de effecten van metformine in de darm,¹⁰ de mogelijke rol van metformine bij preventie en behandeling van kanker¹¹ en zelfs veroudering.¹² Bovendien er is vooruitgang geboekt bij het ontrafelen van de werkingsmechanismen van metformine.¹³ Niettemin is de aanzienlijke variabiliteit in reactie op metformine nog steeds niet volledig begrepen. Genetische variatie speelt een belangrijke rol. Zo kan 34% van de variatie in HbA1c-reductie verklaard worden door genetische verschillen.¹⁴ De resultaten van studies naar polymorfismen zijn echter teleurstellend, omdat verschillende onderzoeken eerder gevonden associaties niet konden bevestigen, mede doordat deze studies vaak beperkt werden door kleine aantallen patiënten en variëteit in etniciteit. Daarom werd in 2013 tijdens een internationale workshop over de farmacogenetica van metformine een voorstel gedaan om een “metformine-consortium” in het leven te roepen, bestaande uit meerdere onderzoeksgroepen met inclusie van studies met patiënten van verschillende afkomst.¹⁵ De eerste contacten werden gelegd tijdens een bijeenkomst op het

jaarlijkse congres van de European Association for the Study of Diabetes (EASD) in 2013 in Barcelona, direct na een posterpresentatie van de resultaten van de farmacogenetische analyse van de HOME-studie.¹⁶ Een maand later werd het MetGen Consortium opgericht. MetGen wordt geleid door prof.dr. Ewan Pearson van de universiteit van Dundee en prof. dr. Kathy Giacomini van de universiteit van Californië, San Francisco. Op het moment van schrijven bestaat het consortium uit een verzameling van talrijke cohorten met meer dan 10.000 personen, een aantal dat nog altijd toeneemt.¹⁷

Huidige bevindingen

Metformine verlaagt niet alleen het vitamine B12-gehalte, maar verhoogt ook de serumspiegels van methylmalonzuur (MMA) (HOME-studie)

Eerdere analyse van de HOME studie toonde aan dat metformine geassocieerd is met een verlaging van serum B12, progressief in de tijd en vergezeld gaand met een toename van het serum homocysteïne, wat suggestief is voor B12-tekort op weefselniveau. De huidige studie toonde aan dat metformine na 52 maanden niet alleen het serum-B12 verlaagde, maar ook het MMA verhoogde: metformine verhoogde het MMA aan het einde van de studie in vergelijking met placebo met een gemiddeld verschil van 0,039 $\mu\text{mol/l}$ (95% betrouwbaarheidsinterval 0,019 tot 0,055). Uitgedrukt in gramjaren metformine nam het MMA toe met 0,006 $\mu\text{mol/l}$ per gram jaar (summary mean; 95% betrouwbaarheidsinterval 0,003 tot 0,009, in vergelijking met placebo).

De toename van MMA bij metforminegebruikers gaat gepaard met een significante verslechtering van een gevalideerde score voor klinische neuropathie (HOME-studie)

Gedurende 4,3 jaar leidde metformine in vergelijking met placebo niet tot meer neuropathie. Echter, mediation-analyse toonde aan dat dit nuleffect van metformine op de neuropathie kan worden verklaard door een gunstig effect op neuropathie door verlaging van het HbA1c (een afname van de neuropathiescore van $0,04 \times 0,50 = 0,020$ per metformine gram jaar) en een nadelig effect door het verhogen van MMA (een toename van de neuropathiescore van $0,04 \times 1,06 = 0,042$ per metformine gramjaar). Dit betekent dat de schadelijke effecten van een dalend B12-gehalte wordt geneutraliseerd door de beschermende effecten van metformine door verbetering van de glucoseregulatie.

Metformine heeft geen effect op vitamine D-spiegels (HOME-onderzoek)

Metformine had in vergelijking met placebo geen effect op de 25(OH)D-spiegels, gecorrigeerd voor seizoenseffecten gedurende 16 maanden (coëfficiënt: 1,002 per maand, multiplicatief model, 95% betrouwbaarheidsinterval: 0,998 tot 1,006). Metformine was geassocieerd met een kleine toename van 25(OH)D₂ (coëfficiënt: 1,012 per maand, 95% betrouwbaarheidsinterval 1,003 tot 1,021). 25(OH)D₂ besloeg echter slechts een zeer kleine fractie (3%) van het totaal 25(OH)D. Seizoensvariatie had de grootste impact op 25(OH)D-spiegels.

Het gebruik van metformine vermindert de energie-inname niet (HOME-studie)

In de HOME-studie werd de voedingsinname beoordeeld bij aanvang van de studie, na 1 jaar en na 4,3 jaar volgens de diet history methode. Analyse toonde aan dat metformine de energie-inname niet verminderde ($-31,0$ kcal/d; 95% betrouwbaarheidsinterval $-107,4$ tot $45,4$). Bovendien toonden lineair mixed model analyses geen significant effect van energie-inname als verklaring voor het verschil in gewichtstoename tussen de groepen. Daarom kan het voorkomen van gewichtstoename door metformine niet worden verklaard door een vermindering van de energie-inname.

Ongeveer een derde van het verschil in gewichtstoename tussen metformine en placebo-ontvangers kan worden verklaard door de vermindering van de insulinebehoefte door gebruik van metformine (HOME-studie)

Mediation-analyse toonde aan dat aan het einde van het onderzoek een patiënt die de actuele gemiddelde dosis metformine (2050 mg) ontving $3,2 \pm 0,5$ kg minder gewichtstoename had, in vergelijking met placebo, waarvan ongeveer een derde ($1,2 \pm 0,0$ kg) kan worden verklaard door een verlaging van de insuline-inname door het gebruik van metformine.

De ATM SNP rs11212617 heeft niet alleen invloed op het effect van metformine op HbA1c en insulinebehoefte, maar ook op metformine plasmaconcentraties (HOME-studie)

We analyseerden de invloed van de polymorfismen rs12208357 en rs622342 in het gen dat codeert voor organic cation transporter 1 (OCT1), rs2289669 in het gen dat codeert voor multidrug and toxin extrusion transporter 1 (MATE1) en rs11212617 in het ataxia telangiectasia mutated gene (ATM), op de effecten van metformine op HbA1c en insulinebehoefte (dagelijkse dosis insuline, DDI). Uitkomstmaat was een gecombineerde HbA1c + DDI Z-score. Het minor allel van rs11212617 (ATM) was geassocieerd met een verbeterde Z-score (een afname per

allel van 0,11, 95% betrouwbaarheidsinterval 0,01 tot 0,20) en een lagere plasmaconcentratie van metformine (−0,42 mg/ml per minor allel, 95% betrouwbaarheidsinterval: −0,81 tot −0,03). Het major allel van rs2289669 (MATE1) was ook geassocieerd met een verbeterde Z-score (−0,35, 95% betrouwbaarheidsinterval −0,09 tot −0,60). De plasmaconcentratie van metformine was ook geassocieerd met een verlaging van de Z-score. De dagelijkse dosis metformine was echter de beste voorspeller voor de respons op metformine.

Het C-allel van rs8192675 in het intron van SLC2A2, dat codeert voor de glucosetransporter GLUT2, is geassocieerd met het glucoseverlagende effect van metformine bij diabetes mellitus type 2, vooral bij obese personen (MetGen-analyse)

Een drie-fasen genomewide associatiestudie (GWAS) met meer dan 13.000 deelnemers toonde aan dat het C-allel van rs8192675 in het intron van *SLC2A2*, coderend voor de glucosetransporter GLUT2, was geassocieerd met een 0,17% sterkere verlaging van het HbA1c door metformine. Bij obese personen met twee C-allelen was daalde het HbA1c met gemiddeld 0,33% meer dan bij personen met homozygotie voor het T-allel.

Variatie van transportergenen draagt weinig bij aan de variabiliteit in glycemische respons op metformine bij diabetes mellitus type 2 (MetGen-analyse)

Een meta-analyse werd uitgevoerd in de cohorten van het MetGen Consortium. Negen kandidaat-polymorfismen in vijf transportergenen (OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K en OCTN1) werden in bijna 8000 individuen geanalyseerd. Geen van de varianten toonde een significant effect op de respons van metformine in de primaire analyse of in de oriënterende secundaire analyses.

SAMENVATTING, PRAKTISCHE IMPLICATIES EN TOEKOMSTPERSPECTIEF

Samenvatting

In het eerste deel van dit proefschrift beschrijven we drie studies over mogelijke bijwerkingen van metformine. Ten eerste tonen we aan dat langdurige behandeling met metformine, in vergelijking met placebo, geassocieerd is met een toename van serum-MMA bij patiënten met diabetes mellitus type 2 behandeld met insuline. Dit effect van metformine neemt in de loop van de tijd toe en is afhankelijk van de cumulatieve dosis metformine. De resultaten zijn in lijn met eerdere bevindingen uit de HOME-studie die een progressieve afname van de

serumconcentraties van B12 bij patiënten behandeld met metformine aantonen. Bovendien was de toename in serum-MMA door het gebruik van metformine geassocieerd met een kleine toename van een gevalideerde klinische neuropathie score. Deze uitkomsten suggereren dat de afname van B12 door metformine na verloop van tijd kan leiden tot weefselschade. Ten tweede toonden we aan dat metformine niet geassocieerd is met een verlaging van serum vitamine D-spiegels. Ten derde hebben we laten zien dat een gunstig neveneffect van metformine, het voorkomen van gewichtstoename, niet kan worden verklaard door verminderde voedselinname, aangezien onze analyse toonde dat metformine de calorie-inname niet beïnvloedt. Wel kan ongeveer een derde van het verschil in gewichtstoename tussen metformine en placebo-ontvangers verklaard worden door de vermindering van de insulinebehoefte bij gebruik van metformine.

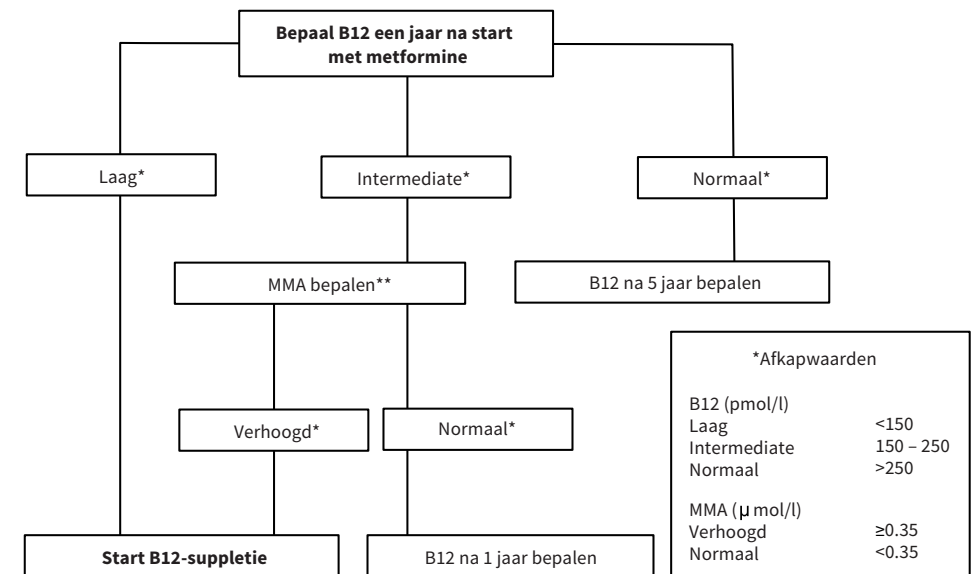
In het tweede deel van het proefschrift beschrijven we drie studies naar de invloed van farmacogenetische variatie op de effecten van metformine. In de eerste farmacogenetische analyse repliceerden we een associatie tussen het minor allel van het ATM-polymorfisme rs11212617 en het effect van metformine. De meest interessante bevinding was dat dit minor allel niet alleen geassocieerd was met een verbeterde behandeluitkomst, maar ook met lagere plasmaconcentraties van metformine. Een verklaring zou kunnen zijn dat rs11212617 de intracellulaire opname van metformine verhoogt, waardoor de werkzaamheid toeneemt. Het target-gen van rs11212617 is nog niet bekend. Het ATM-gen wordt gesuggereerd als de meest waarschijnlijke kandidaat, omdat ATM mogelijk betrokken is bij de acties van metformine.¹⁸ De bevinding dat het minor allel geassocieerd was met lagere plasmaconcentraties, maakt het echter minder waarschijnlijk dat ATM het target-gen is, omdat van ATM niet bekend is dat het betrokken is bij de farmacokinetiek van metformine. Daarom zouden onze bevindingen de theorie kunnen ondersteunen dat rs11212617 de expressie beïnvloedt van transporters die betrokken zijn bij de cellulaire opname van metformine in de lever of de darm. Daarnaast vonden we associaties tussen het MATE1-polymorfisme rs2289669 en de respons op metformine. De dagelijkse dosis metformine was echter de beste voorspeller van het behandelresultaat. De tweede en derde farmacogenetische studies zijn publicaties van het MetGen Consortium. Een GWAS met patiënten uit de MetGen-cohorten vond dat het C-allel van rs8192675 in het intron van *SLC2A2*, coderend voor de glucosetransporter GLUT2, was geassocieerd met een verbeterde respons op metformine, in het bijzonder bij obese patiënten. Ten slotte vond een meta-analyse van het MetGen Consortium bij geen van de negen geanalyseerde transportergenvarianten een significant effect op de respons van metformine.

Praktische implicaties

Internationale richtlijnen erkennen het risico op B12-deficiëntie als een nadeel van metformine.³ Ze adviseren echter om te overwegen B12-waarden te meten, zonder krachtige aanbevelingen te doen. De meest recente versie van de Nederlandse richtlijnen voor de behandeling van diabetes type 2 beveelt screening op B12-deficiëntie tekort bij metforminegebruikers niet aan.¹⁹ De herziening van de richtlijn die inmiddels in conceptvorm verschenen is heeft vooral de adviezen over combinatietherapie aangepast.²⁰ Echter, we hebben begrepen dat de rubriek met aanbevelingen over bijwerkingen van metformine ongewijzigd zal blijven tot de volgende herziening (persoonlijke communicatie per e-mail met de Nederlandse richtlijncommissie, 18 december 2017). Onze bevindingen zijn echter een belangrijke aanwijzing dat metformine-gerelateerde B12-deficiëntie klinisch relevant is. Monitoring van B12 bij langdurig gebruik van metformine moet worden overwogen, vooral bij patiënten met neuropathie of macrocytaire anemie. Ik stel een stroomdiagram voor om te screenen op B12-tekort bij gebruikers van metformine (figuur 2) en adviseer om de B12-waarden één jaar na het begin van het gebruik van metformine te meten. Daarnaast adviseer ik om het MMA te testen wanneer B12-waarden alleen onvoldoende duidelijkheid geven. Afhankelijk van de uitkomst kan men besluiten om te beginnen met B12-suppletie of om de B12-meting na één of vijf jaar te herhalen. Ik heb een voorstel opgenomen voor afkapwaarden van B12- en MMA-niveaus.^{21–23} Aangezien er echter nog geen consensus is over afkapwaarden voor B12 en MMA is het ook optioneel om lokale afkapwaarden te gebruiken.^{21–23} Idealiter vergt dit voorstel nader onderzoek ter bevestiging.

Toekomstperspectief

Zestig jaar na het eerste klinische gebruik is er nog veel te ontdekken over metformine. Tegenwoordig is metformine goed ingeslepen als de eerste keuze voor orale behandeling van type 2 diabetes. Afgezien van vergelijkingen met sulfonyleureumderivaten en insuline zijn er geen lange-termijn data die metformine als eerste keuze behandeling vergelijken met nieuwere glucoseverlagende middelen zoals SGLT2-remmers en GLP-1 receptoragonisten. Daarnaast blijft er onzekerheid bestaan over de vraag of metformine het risico op cardiovasculaire aandoeningen bij patiënten met diabetes type 2 vermindert, vooral als gevolg van een gebrek aan gerandomiseerde langetermijnonderzoeken. Aangezien metformine uit patent is en als voorkeursbehandeling 'ethisch bijna onvermijdelijk' bij de behandeling van diabetes type 2,³ zijn nieuwe grote placebogecontroleerde onderzoeken met metformine moeilijk uit



Figuur 2. Stroomdiagram voor screening op B12-deficiëntie bij metforminegebruikers

* Aangezien er nog geen consensus is over afkapwaarden voor B12 en MMA, is het ook optioneel om lokale afkapwaarden te gebruiken. ** Vooral bij patiënten met neuropathie of anemie.

te voeren. Er zijn echter verschillende studies op komst voor mensen zonder diabetes type 2. Het Bethesda Diabetes Research Center met dr. Adriaan Kooy als hoofdonderzoeker staat op het punt te beginnen met de *Pregnancy Outcomes: Effects of Metformin* (POEM) studie, een multicenter gerandomiseerde driefase studie met metformine in zwangerschapsdiabetes. Daarnaast lopen er diverse in vitro en in vivo studies naar de mogelijke effecten van metformine op voorkomen en behandelen van kanker.¹¹ Bovendien staan drie grote studies naar effecten van metformine op veroudering op het punt om te beginnen met inclusie.¹² Het zal interessant zijn om te zien of deze onderzoeken zullen leiden tot nieuwe indicaties voor het gebruik van metformine. De tijd zal leren of metformine de eerstekeusbehandeling zal blijven of dat de nieuwe glucoseverlagende middelen de plaats van metformine bij behandeling van type 2 diabetes over zullen nemen. Ten slotte zal het fascinerend zijn om te volgen welke richting het onderzoek in de farmacogenetica zal uitgaan. Bevindingen zoals beschreven in dit proefschrift over de invloed van genetische variatie op effecten van medicatie suggereren dat in de toekomst gestratificeerde geneeskunde op basis van genetische profielen een reële mogelijkheid kan zijn. Wereldwijde samenwerkingsverbanden

zoals het MetGen Consortium zijn nodig om nieuwe farmacogenetische associaties te vinden en te repliceren. Deze mogelijkheden vereisen verdere studie, doorzettingsvermogen en misschien wel het belangrijkste, verbeeldingskracht.

REFERENCES

1. Sterne J. Du nouveau dans les antidiabétiques. La NN dimethylamine guanyl guanidine (N.N.D.G.). Maroc Med. 1957;36:1295-6.
2. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet. 1998;352(9131):854-65.
3. American Diabetes Association. 8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. Diabetes Care. 2018;41(Suppl 1):S73-85.
4. Wiersma TJ, Heine RJ, Rutten GE. Summary of the practice guideline 'Diabetes mellitus type 2' (first revision) of the Dutch College of General Practitioners. Ned Tijdschr Geneesk. 1999;143(33):1688-91.
5. Bouma M, Rutten GE, de Grauw WJ, Wiersma T, Goudswaard AN, Nederlands Huisartsen Genootschap. Summary of the practice guideline 'Diabetes mellitus type 2' (second revision) from the Dutch College of General Practitioners. Ned Tijdschr Geneesk. 2006;150(41):2251-6.
6. Wulfele MG. Effects of Metformin in Patients with Type 2 Diabetes Intensively Treated with Insulin [dissertation]. 2004.
7. de Jager J. The Effects of Metformin on Metabolism and Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes [dissertation]. 2010.
8. Griffin SJ, Leaver JK, Irving GJ. Impact of metformin on cardiovascular disease: a meta-analysis of randomised trials among people with type 2 diabetes. Diabetologia. 2017;60(9):1620-9.
9. de Jager J, Kooy A, Lehert P, et al. Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. BMJ. 2010;340:c2181.
10. McCreight LJ, Bailey CJ, Pearson ER. Metformin and the gastrointestinal tract. Diabetologia. 2016;59(3):426-35.
11. Heckman-Stoddard BM, DeCensi A, Sahasrabudhe VV, Ford LG. Repurposing metformin for the prevention of cancer and cancer recurrence. Diabetologia. 2017;60(9):1639-47.
12. Valencia WM, Palacio A, Tamariz L, Florez H. Metformin and ageing: improving ageing outcomes beyond glycaemic control. Diabetologia. 2017;60(9):1630-8.
13. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. Diabetologia. 2017;60(9):1577-85.
14. Zhou K, Donnelly L, Yang J, et al. Heritability of variation in glycaemic response to metformin: a genome-wide complex trait analysis. Lancet Diabetes Endocrinol. 2014;2(6):481-7.
15. Pawlyk AC, Giacomini KM, McKeon C, Shuldiner AR, Florez JC. Metformin pharmacogenomics: current status and future directions. Diabetes. 2014;63(8):2590-9.
16. Out M, Becker ML, van Schaik RH, et al. SNPs Related to the Glucose Lowering Effect of Metformin: Do they Affect Plasma Concentrations of Metformin (MPC) and their Effects on Insulin Requirements (DDI)? (Abstract). Diabetologia. 2013;56 Suppl 1:388.
17. The Metformin Genetics Consortium; available at: <http://www.pgrn.org/metgen.html>.
18. GoDARTS and UKPDS Diabetes Pharmacogenetics Study Group, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Zhou K, et al. Common variants near ATM are associated with glycaemic response to metformin in type 2 diabetes. Nat Genet. 2011;43(2):117-20.
19. Rutten GEHM, De Grauw WJC, Nijpels G, et al. NHG-Standaard Diabetes mellitus type 2((derde herziening)). Huisarts Wet. 2013;56:515.
20. Diabetes mellitus type 2 in de tweede lijn (concept). Geïnitieerd door de Nederlandse Internisten Vereniging, in samenwerking met Diabetesvereniging Nederland. 2018;.
21. Bailey RL, Carmel R, Green R, et al. Monitoring of vitamin B-12 nutritional status in the United States by using plasma methylmalonic acid and serum vitamin B-12. Am J Clin Nutr. 2011;94(2):552-61.
22. Bailey RL, Durazo-Arvizu RA, Carmel R, et al. Modeling a methylmalonic acid-derived change point for serum vitamin B-12 for adults in NHANES. Am J Clin Nutr. 2013;98(2):460-7.
23. van Wijngaarden JP, Dhonukshe-Rutten RAM, Brouwer-Brolsma EM, et al. Vitamin B12 Intake and Related Biomarkers: Associations in a Dutch Elderly Population. J Nutr Health Aging. 2017;21(10):1268-76.